

تمایز اسکروتومی سلول‌های سوماتی هم‌کشتی داده شده با نوتوکورد جنین جوجه

رزگار رهبری M.Sc.^۱، محمد مازنی Ph.D.^۱، محمدقاسم گل محمدی Ph.D.^۲، محسن سقا Ph.D.^{۲*}

۱- گروه علوم بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲- آزمایشگاه تحقیقاتی جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.sagha@arums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱۶

چکیده

هدف: سوماتیت‌ها توده‌های اپی‌تلیالی از سلول‌های مزودرمی هستند که به اسکروتوم و درمومیوتوم تمایز می‌یابند و نوتوکورد یا مزودرم محوری در تمایز سلول‌های سوماتی به اسکروتوم نقش دارد. هدف از این مطالعه بررسی نقش نوتوکورد در تمایز اسکروتومی سوماتیت‌ها در محیط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پس از جدا سازی سوماتیت‌ها و نوتوکورد از جنین جوجه و قرار دادن نوتوکورد ها در قطرات آلژینات، آن‌ها با سوماتیت‌ها به مدت شش روز در محیط آزمایشگاهی هم‌کشتی داده شدند. در گروه بدون هم‌کشتی نیز سوماتیت‌ها بدون حضور نوتوکورد کشت داده شدند. سوماتیت‌های تازه جدا شده و کشت داده نشده نیز به عنوان سوماتیت‌های روز صفر در نظر گرفته شدند. در نهایت مورفولوژی سلول‌های سوماتی کشت داده شده با میکروسکوپ اینورت مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس با روش RT-PCR بیان ژن‌های تمایزی اسکروتومی و درمومیوتومی در سلول‌های سوماتی کشت داده شده بررسی شد.

نتایج: در مقایسه با گروه کنترل، سلول‌های سوماتی به دنبال هم‌کشتی با نوتوکورد پتانسیل تمایز بهتری داشتند و مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی با زوائد متعدد و باریک را نشان دادند. پروفایل بیان ژنی نیز حاکی از بیان ژن‌های Pax1 و BMP4 و بیان ضعیف MyoD در سلول‌های سوماتی به دنبال هم‌کشتی با نوتوکورد بود که از ویژگی‌های تمایز به سلول‌های اسکروتومی محسوب می‌شود.

نتیجه گیری: نوتوکورد رویانی در محیط آزمایشگاهی به دنبال افزایش بیان ژن‌های دخیل در تمایز اسکروتوم سبب القای این تمایز در سوماتیت‌ها می‌گردد.

واژگان کلیدی: جنین جوجه، سوماتیت، هم‌کشت، نوتوکورد

مقدمه

مزودرم پاراگزپال رویان در حد فاصل بین لوله عصبی و نوتوکورد در سمت داخل و مزودرم بینابینی و مزودرم صفحه جانبی در سمت خارج قرار دارد. بخش سری این مزودرم به سوماتومر تبدیل می‌شود در حالی‌که در بخش دمی به مزودرم پیش‌سوماتی و سومات تمایز می‌یابد (۱). سومات‌ها به‌صورت توده‌هایی از بافت‌های اپی‌تلیالی هستند که حول محور سری - دمی رویان از بخش سری مزودرم پیش سوماتی با فواصل منظم نسبت به هم جوانه می‌زنند (۲).

بافت‌های اطراف سومات در تشکیل، تکثیر، تمایز و نیز حفظ و بقای سلول‌های سوماتی نقش حیاتی ایفا می‌کنند (۴، ۵). در پی یک‌سری تعاملات سلولی با بافت‌های اطراف، سلول‌های سوماتی از حالت اپی‌تلیالی تغییر حالت داده و قسمت شکمی داخلی آن‌ها به سلول‌های اسکروتومی تمایز می‌یابد که در نهایت به غضروف و استخوان تبدیل می‌شوند. قسمت پشتی طرفی سومات‌ها نیز با ایجاد درمومیوتوم عضلات و پوست بدن را می‌سازد (۳ و ۶).

نوتوکورد نیز یک ساختار مزودرمی متشکل از سلول‌های بزرگ با غلاف خارج سلولی ضخیم است که در زیر لوله عصبی قرار دارد (۷) و در مهره داران عالی دو نقش مهم بر عهده دارد. اولین نقش آن با توجه به مکان قرار گرفتن نوتوکورد در خط میانی پشتی رویان مهره‌داران، ترشح فاکتورهایی است که بر روی همه بافت‌های اطراف از جمله لوله عصبی (۸) و سومات اثر گذاشته و در تعیین سرنوشت، بقا و مهاجرت سلول‌های تشکیل دهنده این بافت‌ها نقش دارد (۹-۱۲). دومین وظیفه نوتوکورد نیز نقش مهم ساختاری آن است که در نهایت به دیسک بین مهره تمایز می‌یابد (۱۳).

تحقیقات نشان می‌دهند که وجود لوله عصبی و نوتوکورد برای تکوین طبیعی مهره‌داران ضروری بوده و این بافت‌ها نقش حیاتی را در الگویابی و تکثیر و بقای سلول‌های سوماتی ایفا می‌کنند (۱۴، ۱۵ و ۱۶). نوتوکورد با رهایی برخی از فاکتورها مانند Noggin و Sonic Hedge Hog (SHH) (۳) و نیز لوله عصبی با آزاد سازی عواملی مانند Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) و Wnt و Neurotrophin 3 (NT-3) باعث تمایز رده‌های سلولی سوماتی می‌شوند (۱۷ و ۱۸). SHH مترشحه از نوتوکورد مانع از انتشار سیگنال‌هایی می‌گردد که موجب القا پشتی شدن در قسمت شکمی سومات می‌شوند و بدین شکل از گسترش ناحیه درمومیوتوم به ناحیه اسکروتوم جلوگیری

می‌کند (۱۹، ۲۰، ۲۱). از طرفی نوتوکورد توانایی القا بیان Pax1 را در بخش شکمی داخلی سومات به‌طور مستقیم از طریق SHH دارند (۲۲).

مثال فوق نمونه‌ای از واکنش‌های القایی در رویان است که در آن سیگنال‌هایی از یک گروه سلولی روی گروه سلولی مجاور تاثیر گذاشته و باعث حفظ حیات، تکثیر و تمایز آن‌ها می‌شود. لذا شناخت دقیق بیولوژی سلول‌های بدن و نحوه تکوین و تمایز آن‌ها و نیز چگونگی پاسخ‌دهی آن‌ها به عوامل درونی و بیرونی شرایطی را فراهم کرده است که می‌توان در سلول درمانی و نیز بررسی فرایندهای مرگ سلولی و سمیت سلولی از آن‌ها بهره جست. از همین رو دسترسی به مدل‌های سلولی مناسب نخستین گام در جهت مطالعه فرایندهای فوق‌الذکر در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

برای این منظور، سیستم‌های هم‌کشتی روش مناسبی برای مطالعه تعاملات موجود بین بافت‌های متفاوت هستند و در این راستا محققان زیادی از این روش در تحقیقات خود استفاده کرده‌اند (۲۳، ۲۴ و ۲۵). لذا با توجه به قدرت سیگنال دهی نوتوکورد در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های بنیادی رویانی (۲۶ و ۲۷) و از آنجایی‌که این ارگان مجاورت نزدیکی در بدن رویان با سومات‌ها دارد، در این مطالعه اثرات نوتوکورد در تمایز اسکروتومی سلول‌های سوماتی در محیط آزمایشگاهی با استفاده از روش هم‌کشتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی سومات از جنین جوجه: تخم مرغ‌های نطفه‌دار از مرغ‌داری‌های اطراف اردبیل تهیه شدند و در ۳۷/۵ تا ۳۸/۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۵۰ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند تا جنین‌های جوجه مطابق با جدول تکوینی هامبورگر - هامپلتون (۲۸) به مرحله ۱۰ تا ۱۲ سوماتی برسند. سپس جنین‌ها از سطح زرده جدا شده و در محیط کشت Leibovitz's (L15) قرار داده شدند. برای جداسازی راحت‌تر سومات‌ها، جنین‌ها به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در آنزیم Dispase با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر قرار داده شدند و پس از خنثی شدن اثر آنزیم توسط سرم جنینی گاو (FBS) سومات‌ها و نوتوکورد در زیر استریومیکروسکوپ به کمک سوزن‌های انسولینی از جنین جوجه جدا شدند.

در دو گروه سوماتیت همراه با نوتوکورد و سوماتیت بدون نوتوکورد به مدت ۶ روز کشت داده شدند. سوماتیت‌های تازه جدا شده نیز به‌عنوان کنترل روز صفر در نظر گرفته شدند.

RT-PCR: RNA توتال سلول‌های سوماتیتی همه گروه‌ها با استفاده از محلول Trizol استخراج شد. سپس مطابق با دستورالعمل سازنده superscript II RNase H⁻ reverse transcriptase ۱ میکروگرم از RNA توتال برای سنتز cDNA در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت. فهرست و توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است. محصولات PCR بر روی ژل‌های آگاروز ۱/۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) الکتروفورز شدند و باند ایجاد شده به کمک نور UV مشاهده شد.

تهیه دانه‌های آلزینات حاوی نوتوکورد: برای جلوگیری از ادغام با سوماتیت‌ها، نوتوکورد‌های جدا شده در داخل قطرات آلزینات قرار داده می‌شوند. برای تهیه این قطرات، به‌کمک محلول ۰/۱۵ مولار NaCl محلول ۱/۲ درصد از پودر آلزینات تهیه شد. پس از دو بار شستشوی سوماتیت‌ها در PBS فاقد کلسیم و منیزیم، قطرات ۱۵ تا ۲۰ میکرولیتری از محلول آلزینات حاوی نوتوکورد (دانه‌های آلزینات) به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱۰۲ مولار CaCl₂ قرار داده شدند. در نهایت این دانه‌ها ۲ بار در محلول ۰/۱۵ مولار NaCl شستشو داده شدند.

هم‌کشتی سلول‌های سوماتیتی و نوتوکورد: سوماتیت‌ها و قطرات آلزینات حاوی نوتوکورد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ در محیط کشت DMEM/F12^{GLutaMax} + 10% FBS، ۱ میلی‌مولار اسیدآمینه غیرضروری، ۱ میلی‌مولار پنی‌سیلین و استرپتومایسین، ۰/۱ میلی‌مولار بتا- مرکاپتواتانل

جدول ۱: فهرست و توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده.

Gene	Primer Sequence (5'→3')
GAPDH	F: AGTCATCCCCTGAGCTGAATG R: AGGATCAAGTCCACAACACG
Pax3	F: GCGTCGCAGCAGGACAACCT R: GCGCTGGGTGGAAACCCTCC
BMP4	F: GACCGGCAGGAAGAAAGTCG R: GCACGCTGCTGCTGAGGTTGAAG
Pax1	F: GCTGGGTGGTGTCTTCGTGAAC R: ACTGGTAAAGGGGTTGTAGGG
MyoD	F: ACTACACGGAATCACCAAATGACC R: AAGGAATCTGGGCTCCACTGTC

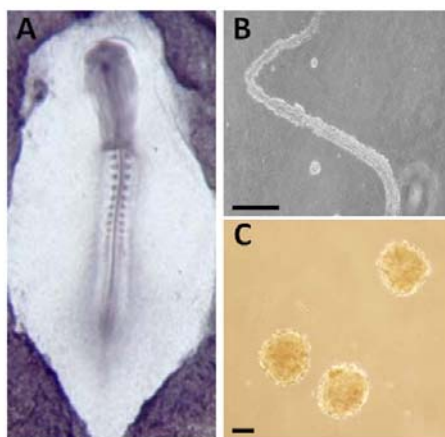
F: Forward

R: Reverse

نسبتاً پهن و کوچک با زوائد متعدد و باریک برخوردار بودند.

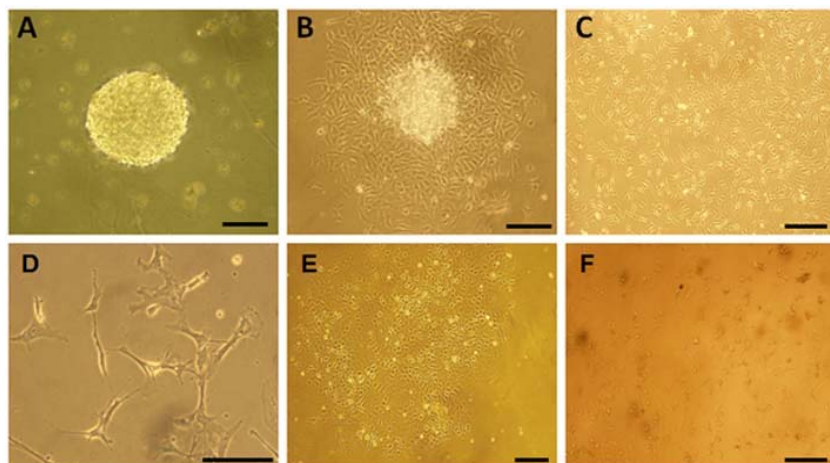
نتایج

نتایج مشاهدات مورفولوژیکی



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست از جنین جوجه در مرحله ۱۰ سوماتیتی (A) و نوتوکورد (B) و سوماتیت‌های جدا شده از این جنین (C) (Bar= 100 μm).

بعد از استخراج جنین جوجه در مراحل ۱۰ تا ۱۲ سوماتیتی از سطح زرده (شکل ۱A) و جداسازی نوتوکورد (شکل ۱B) و سوماتیت از آن (شکل ۱C)، سوماتیت‌ها در ظروف حاوی محیط کشت قرار داده شدند (شکل ۲A). بررسی‌های مورفولوژیکی در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که سلول‌های سوماتیتی پس از دو روز کشت با نوتوکورد و نیز بدون حضور نوتوکورد از گوشه‌های سوماتیت شروع به رشد و تکثیر نموده (شکل E و ۲B) و پس از شش روز کشت توانستند به‌صورت سلول‌هایی با ظاهر سلول‌های مزانشیمی تمایز یابند؛ اگرچه تعداد این سلول‌ها در گروه بدون هم‌کشتی کمتر بود (شکل F و ۲C). از طرف دیگر، مطابق با شکل ۲D سلول‌های مزانشیمی از یک جسم سلولی

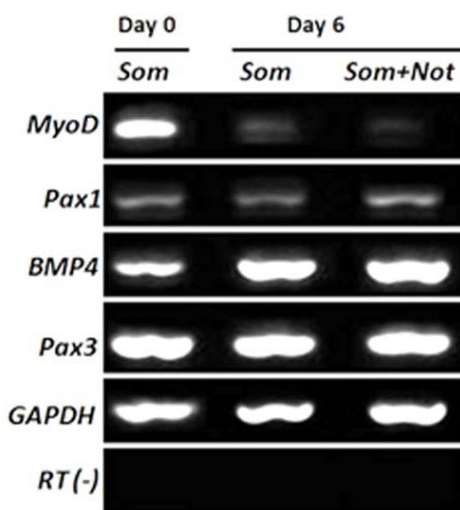


شکل ۲: گسترش و تمایز سلول‌های سوماتی. (A) سوماتیت جدا شده از بدن جنین جوجه، (B) گسترش سلول‌های سوماتی پس از دو روز هم‌کشتی با نوتوکورد، (C) مورفولوژی سلول‌های سوماتی پس از شش روز هم‌کشتی. (D) فتومیکروگراف با بزرگنمایی بیشتر از سلول‌های مزانشیمی حاصل از تمایز سلول‌های سوماتی، (E) سلول‌های سوماتی پس از دو روز کشت در گروه بدون هم‌کشتی و (F) تمایز آن‌ها پس از شش روز کشت. Bar= 100 μ m

نتایج RT-PCR

گروه سوماتیت همراه با نوتوکورد بیان بیشتری را نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد. MyoD نیز که نشانگر قسمت میوتومی سوماتیت‌ها می‌باشد در سوماتیت‌های تازه جدا شده از شدت بیان بیشتری برخوردار بود. هرچند بیان این ژن در گروه سوماتیت بدون نوتوکورد کاهش یافته بود ولی کمترین بیان این ژن در گروه سوماتیت همراه با نوتوکورد مشاهده شد. از طرف دیگر، ژن BMP4 در گروه سوماتیت همراه با نوتوکورد بیشترین بیان را داشته و بعد از آن در گروه سوماتیت بدون نوتوکورد و به‌میزان کمتر در سوماتیت‌های روز صفر بیان شده بود.

با روش RT-PCR بیان ژن‌های GAPDH، Pax3، BMP4، Pax1 و MyoD در گروه سوماتیت‌های تازه جدا شده (سوماتیت روز صفر)، گروه سوماتیت بدون هم‌کشتی با نوتوکورد و گروه سوماتیت هم‌کشتی داده شده با نوتوکورد پس از ۶ روز کشت مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳). نتایج RT-PCR نشان داد که Pax3 که نشانگر قسمت درمومیوتوم سوماتیت‌ها می‌باشد در هر سه گروه فوق‌الذکر بیان قابل توجهی داشت اما در گروه بدون هم‌کشتی بیان آن کمی شدیدتر به‌نظر می‌رسید درحالی‌که Pax1 که نشانگر قسمت اسکروتوم سوماتیت است. در



شکل ۳: بیان ژن‌های مختلف تمایز به اسکروتوم و درمومیوتوم در گروه سوماتیت‌های تازه جدا شده از جنین جوجه (روز صفر) و گروه‌های سلول‌های سوماتی پس از شش روز هم‌کشتی با نوتوکورد (Som + Not) و بدون نوتوکورد (Som). MyoD = نشانگر تمایز میوتومی، Pax1، BMP4 = نشانگرهای تمایز اسکروتومی، Pax3 = نشانگر تمایز درمومیوتوم، GAPDH = ژن خانگی

بحث

(۲۱ و ۳۲). لذا، بیان ضعیف Pax1 در گروه سومات‌های روز صفر تأییدی بر این یافته می‌باشد.

همچنین نشان داده شده است که بیان Pax3 مستقل از ساختار میانی می‌باشد و نیازی به این ارگان‌ها ندارد (۲۲). بنابراین در صورت عدم حضور نوتوکورد نیز Pax3 بیان بالایی خواهد داشت. Pax3 در گروه سومات بدون نوتوکورد تا حدی بیان بیشتری نسبت به گروه سومات همراه با نوتوکورد داشت و به نظر می‌رسد که بیان کمی پایین‌تر Pax3 در گروه سومات همراه با نوتوکورد مربوط به تمایز اسکروتومی سلول‌ها در این گروه می‌باشد.

مطالعات نشان می‌دهند که حضور نوتوکورد و سیگنال آن SHH برای فعال سازی ژن Pax1 کافی است اما برای فعال سازی ژن MyoD و تعیین رده میوژنیک به‌تنهایی کافی نیست بلکه برای فعال سازی آن حضور Wnt مترشحه از لوله عصبی نیز ضروری می‌باشد (۲۹، ۱۶ و ۳۳). داده‌های ما نیز نشان داد که بیان MyoD در گروه کنترل به‌مراتب بیشتر از دو گروه دیگر است و بیان این ژن در گروه سومات بدون نوتوکورد بیشتر از سومات همراه با نوتوکورد می‌باشد. احتمالاً بیان شدید MyoD در سومات‌های روز صفر به دلیل مجاورت آن‌ها با صفحه عصبی و بخش پشتی لوله عصبی می‌باشد. بیان ضعیف MyoD در سلول‌های گروه هم‌کشتی تأیید دیگری بر تمایز اسکروتومی و نه میوتومی سلول‌های سوماتی به‌دنبال هم‌کشتی با نوتوکورد است.

گرچه برخی از مطالعات بیان BMP4 در مزودرم پاراگزیمال را دلیلی بر افزایش آپوپتوز در این بافت می‌دانند (۳۴) ولی گروهی از محققین بر این باورند که افزایش بیان BMP4 مربوط به تمایز سلول‌ها به سمت غضروفی شدن می‌باشد چرا که SHH میزان پاسخ‌دهی به BMP4 را در سلول‌های اسکروتومی افزایش می‌دهد و موجب افزایش بیان BMP4 می‌شود (۶). یافته‌های ما نیز بیان بیشتر BMP4 را در گروه هم‌کشتی با نوتوکورد نشان داد و این توجیه دیگری بر تمایز اسکروتومی سلول‌های سوماتی به‌دنبال هم‌کشتی با نوتوکورد می‌تواند باشد.

نتیجه گیری

در مجموع این مطالعه نشان می‌دهد که به‌دنبال هم‌کشتی با نوتوکورد سلول‌های سوماتی توانستند تمایز یافته و مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی با مشخصات سلول‌های اسکروتومی یعنی بیان ژن‌های Pax1 و BMP4 و بیان ضعیف MyoD را پیدا

حضور بافت‌های اطراف سومات برای حفظ بقا سلول‌های سوماتی و همچنین الگویابی آن‌ها لازم و ضروری می‌باشد (۳، ۴ و ۵) و سومات‌ها پس از شکل‌گیری در طرفین لوله عصبی تحت تأثیر بافت‌های اطرافشان به سلول‌های مزانشیمی اسکروتومی و در مومیوتومی تمایز می‌یابند (۳ و ۶). همچنین مشخص شده است که در صورت عدم حضور ارگان‌های میانی رویان (نوتوکورد و لوله عصبی) اغلب رده‌های سلولی حاصل از سومات‌ها دچار آپوپتوزیس می‌شوند ولی به‌دنبال پیوند زدن این ارگان‌ها به سلول‌های سوماتی میزان مرگ سلولی در آن‌ها کاهش می‌یابد (۱۴ و ۱۵). یافته‌های مورفولوژیک مطالعه حاضر نیز نشان دادند که در گروه سومات همراه با نوتوکورد تمایز سلول‌ها به سمت مزانشیمی شدن بوده و سلول‌هایی با زوائد باریک و متعددی شکل گرفتند. همچنین اجسام آپوتوتیک کمتری در این گروه نسبت به گروه فاقد نوتوکورد مشاهده شد.

مشخص شده است که حضور نوتوکورد و SHH نقش اساسی در القا و شکل‌گیری سلول‌های اسکروتومی دارد (۲۹، ۲۲ و ۳۰). Pax1 و Pax9 به‌طور وسیعی در سلول‌های اسکروتومی بیان می‌شوند درحالی‌که در قسمت میوتوم بیان نشانگر MyoD و در قسمت در مومیوتوم بیان ژن Pax3 را خواهیم داشت (۶ و ۳۱). ژن‌های Pax1 و MyoD در حضور نوتوکورد و لوله عصبی بیان شده و باعث تمایز رده‌های سلولی سوماتی می‌شود (۲۲ و ۲۹). با این‌حال، SHH مترشحه از نوتوکورد مانع از انتشار سیگنال‌هایی می‌گردد که موجب القا پشتی شدن در قسمت شکمی سومات می‌شوند و بدین‌شکل از گسترش ناحیه در مومیوتوم به ناحیه اسکروتوم جلوگیری می‌کند (۱۹، ۲۰ و ۲۱).

نتایج RT-PCR تحقیق حاضر نیز نشان داد که بیان Pax1 در گروه سومات همراه با نوتوکورد به‌مراتب بیشتر از گروه سومات بدون نوتوکورد و گروه سومات روز صفر بود و این موضوع نشان‌دهنده آن است که سلول‌های سوماتی در حضور نوتوکورد تمایز یافته و احتمالاً به اسکروتوم تبدیل شده‌اند. این نتایج در تأیید مشاهدات قبلی است که حضور نوتوکورد و SHH مترشحه از آن را برای بیان ژن Pax1 در سلول‌های سوماتی و تعیین رده سلولی اسکروتومی لازم و ضروری میدانند (۲۱ و ۲۹). همچنین مشخص شده بود که Pax1 در مزودرم پیش سوماتی جنین جوجه و سومات‌های تازه تشکیل شده بیان بسیار ضعیفی دارد

کنند که از ویژگی‌های تمایز به سلول‌های میوتومی است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با استفاده از منابع مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی اردبیل انجام شده است و نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی این دانشگاه به‌عمل می‌آورند.

منابع

1. Stockdale FE, Nikovits WJr, Christ B. Molecular and cellular biology of avian somite development. *Dev Dyn*. 2000; 219: 304-21.
2. Pourquie O. Vertebrate somitogenesis: A novel paradigm for animal segmentation? *Int J Dev Bio*. 2003; 47(7-8): 597-603.
3. Hirsinger E, Jouve C, Malapert P, Pourquie O. Role of growth factors in shaping the developing somite. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 140:83-7.
4. Gilbert S. Developmental biology. 9th Ed.: sinauer associates, Inc. 2010.
5. Bothe I, Ahmed MU, Winterbottom FL, von Scheven G, et al. Extrinsic versus intrinsic cues in avian paraxial mesoderm patterning and differentiation. *Dev Dyn*. 2007; 236(9): 2397-2409.
6. Murtaugh LC, Chyung JH, Lassar A. Sonic hedgehog promotes somatic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. *Gen Dev*. 1999; 13: 225-237.
7. Stemple DL. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development*. 2005; 132: 2503-2512.
8. Placzek M, Dodd J, Jessel TM. The case for floor plate induction by the notochord. *Curr Opin Neurobiol*. 2000; 10(1): 15-22.
9. Hassanzadeh Taheri MM, Nikraves MR, Djalali M, Fazel AR, et al. Distribution of specific glycoconjugates in early mouse embryonic notochord and paraxial mesenchyme. *Ir Biom J*. 2005; 9(1): 21-26.
10. Dockter JL. Sclerotome induction and differentiation. *Curr Top Biol*. 2000; 48:77-127.
11. Fan CM, Lavigne LM. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell*. 1994; 79: 1175-1186.
12. Christ B, Huang R, Wilting J. The development of the avian vertebral column. *Anat Embryol*. 2000; 202: 179-194.
13. Sachdev SW, Dietz UH, Oshima Y, Lang MR, et al. Sequence analysis of zebrafish chondromodulin-1 and expression profile in the notochord and chondrogenic regions during cartilage morphogenesis. *Mech Dev*. 2001; 105: 157-162.
14. Gordon M, Jay W, Frank E. Sonic hedgehog enhances somite cell viability and formation of primary slow muscle fibers in avian segmented mesoderm. *Anat Embryol*. 1999; 200: 239-252.
15. Asakara A, Tapscott SJ. Apoptosis of apaxial myotome in danforth's Short-tail (SD) mice in somites that form following notochord degeneration. *Dev Biol*. 1998; 203(2): 276-289.
16. Munsterberg A, Lassar A. Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite. *Development*. 1995; 121: 651-660.
17. Loganathan PG, Nimmagadda S, Scaal M, Huang R, et al. Wnt signaling in somite development. *Ann Anat*. 2008; 190: 208-222.
18. Galli LM, Willert K, Nusse R, Yalonka-Reuvent Z, et al. A proliferative role Wnt-3a in chick somites. *Dev Biol*. 2004; 269: 489-504.
19. Pourquie O, Coltey M, Teillet M-A, Ordahl C, et al. Control of dorsoventral patterning of somatic derivatives by notochord and floor plate. *Dev Biol*. 1993; 90: 5242-4246.
20. Borycki AG, Mendham L, Emerson CPJr. Control of somite patterning by sonic hedgehog and its downstream signal response genes. *Development*. 1998; 125: 777-79021.
21. Bumcrot DA, McMahon AP. Sonic signals somites. *Curr Biol*. 1995; 5(6): 612-614.
22. Marcelle C, Ahlgren S, Bronner M. In vivo regulation of somite differentiation and proliferation by sonic hedgehog. *Dev Biol*. 1999; 214: 277-287.
23. Kitazawa A, Shimizu N. Differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia. *J Biosci Bioeng*. 2005; 100(1): 94-99.
24. Fontaine-Perus J, Jarno V, Fournier L, Ray C, et al. Mouse chick chimera: a new model to study the in ovo developmental potentialities of mammalian somites. *Development*. 1995; 121:1705-1718.
25. Sagha M, Karbalaie K, Tanhaee S, Esfandiari E, et al. Neural induction in mouse embryonic stem cells by co-culturing with chicken somites. *Stem Cell Dev*. 2009; 18(9): 1351-1359.
26. Anjomshoa M, Karbalaie K, Mardani M, Razavi S, et al. Generation of motor neurons by coculture of retinoic acid-pretreated embryonic stem cells with chicken notochords. *Stem Cell Dev*. 2009; 18(2): 259-67.

27. Salehi H, Karbalaie K, Razavi S, Tanhaee S, et al. Neuronal induction and regional identity by co-culture of adherent human embryonic stem cells with chicken notochords and somites. *Int J Dev Biol.* 2011; 55: 321-326.
28. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of chick embryo. *J Morph.* 1951; 88: 49-99.
29. Alves HJ, Alvares LE, Gabriel JE, Coutinho LL. Influence of the neural tube/notochord complex on MYOD expression and cellular proliferation in chicken embryos. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(2): 191-197.
30. Teillet M, Watanabe Y, Jeffs P, Duprez D, et al. Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages. *Development* 1998; 125: 2019-2030.
31. Peters H, Doll U, Niessing J. Differential expression of the chicken Pax-1 and Pax-9 gene: In situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Dev Dyn.* 1995; 203: 1-16.
32. Borycki AG, Li J, Jin F, Emerson CP Jr, et al. Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation. *Development* 1999; 126: 1665-1674.
33. Borycki AG, Brown AM, Emerson CP. Shh and Wnt signaling pathways converge to control Gli gene activation in avian somites. *Development* 2000; 127: 2075-2087.
34. Sanders E, Parker E. Ablation of axial structures activates apoptotic pathways in somite cell of the chick embryo. *Anat Embryol.* 2005; 204: 389-398.

Sclerotomal Differentiation of Somitic Cells Co-Cultured with Chicken Embryonic Notochord

Rahbari R, M.Sc.¹, Mazani M, Ph.D.¹, Golmohammadi MGh, Ph.D.², Mohsen Sagha M, Ph.D.^{2*}

1. Department of Biochemistry, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2. Research laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

* Email corresponding author: m.sagha@arums.ac.ir

Received: 25 May. 2013

Accepted: 8 Oct. 2013

Abstract

Aim: The somites are epithelial blocks of mesodermal cells differentiating to sclerotome and dermomyotome and notochord or axial mesoderm plays a major role in somitic cell differentiation to sclerotome. This study was aimed to evaluate the role of the notochord in sclerotomal differentiation of the somites *in vitro*.

Material and Methods: In this experimental study, isolated notochords from chick embryo were encapsulated in alginate beads and co-cultured with somites for six days. In control group, the somites were cultured alone. Newly isolated and non-cultured somites were considered as somites on day 0. Eventually, morphology of cultured somitic cells was evaluated by inverted microscope and then RT-PCR method was used to analyze the sclerotomal and dermomyotomal gene expression profile.

Results: In comparison with control group, the somitic cells co-cultured with notochord had highly differentiation potential and showed mesenchymal morphology with numerous slender processes. Gene expression profile of co-cultured somitic cells indicated upregulation of *Pax1* and *BMP4* and downregulation of *MyoD*, presenting sclerotomal cell characteristics.

Conclusion: Embryonic notochord can induce *in vitro* sclerotomal differentiation in somites through upregulation of genes involving in this differentiation.

Keywords: Chick embryo, Co-culture, Notochord, Somite